昆 虫 学 报 *Acta Entomologica Sinica*, December 2011, 54(12): 1341 -1347 ISSN 0454-6296

家蚕胚胎细胞系 Bm-Em-1 的建立和特性研究

李苗苗，郑桂玲，李长友*
（青岛农业大学农学与植物保护学院，山东青岛 266109）

摘要：昆虫细胞系在病毒生物学、基因功能的研究以及杆状病毒表达系统生产重组蛋白的应用中发挥着重要的作用。本研究由家蚕 *Bombyx mori*“大造”品种反转期胚胎建立了一株细胞系 Bm-Em-1，在含 10% 胎牛血清的 TNM-FH 培养基中已传代 40 余代。显微观察表明，细胞形态主要为圆形和短梭形，细胞染色体呈短棒状和颗粒状，数量多、异倍化，符合典型的鳞翅目昆虫细胞染色体特征。RAPD 鉴定结果表明，该细胞系来源于家蚕胚胎，其扩增谱带与 BTI-Tn5B1-4 和 Sf-9 等细胞系明显不同。生长曲线测定结果表明，第 28 代细胞的群体倍增时间为 82.2 h。病毒敏感性测定显示，该细胞系不能被苜蓿银纹夜蛾 *Autographa californica* 核型多角体病毒（AcMNPV）感染，但对家蚕核型多角体病毒（BmNPV）高度敏感，96 h 的感染率为 91.3%。结果说明该细胞系可作为家蚕病毒离体复制、BmNPV 表达系统以及家蚕基因功能研究的理想材料。

关键词：家蚕；细胞系；核型分析；RAPD 指纹图谱；核型多角体病毒；病毒敏感性
中图分类号：Q965.8　　**文献标识码**：A　　**文章编号**：0454-6296(2011)12-1341-07

Establishment and characterization of a new cell line Bm-Em-1 from *Bombyx mori* embryos

LI Miao-Miao, ZHENG Gui-Ling, LI Chang-You* (College of Agronomy and Plant Protection, Qingdao Agricultural University, Qingdao, Shandong 266109, China)

Abstract: Insect cell line is one of the key components in baculovirus expression vector system and plays essential roles in baculoviral biology, identification of gene function, and expression of recombinant proteins, *etc*. In this study, a new cell line designated as Bm-Em-1 from the embryonic tissue of *Bombyx mori* (Lepidoptera: Bombycidae) strain Dazao was established, and this cell line had been subcultured over 40 passages on TNM-FH medium supplemented with 10% fetal bovine serum. Inverted microscope observation showed that this cell line has two major morphological types, *i. e.*, round cells and spindle-shaped cells, and the chromosomes of the cell line were condensed into short rods and granule, typical of lepidopteran cell line. Random amplification of polymorphic DNA (RAPD) analysis showed that the DNA profile of the cell line Bm-Em-1 was similar with that of the embryonic tissue of *B. mori*, but different from that of BTI-Tn5B1-4 and Sf-9 cell lines. Growth curve analysis indicated that the population doubling time of the 28th passage cells was 82.2 h. Virus infection data proved that Bm-Em-1 was highly susceptible to *B. mori* nucleopolyhedrovirus (BmNPV) with the infection ratio up to 91.3% at 96 h post infection, but not susceptible to the *Autographa californica* multiple nucleopolyhedrovirus (AcMNPV). With such high infection rate by BmNPV, this cell line will be an ideal tool for BmNPV replication *in vitro*, BmNPV expression system and gene function study of *B. mori*.

Key words: *Bombyx mori*; cell line; karyotype analysis; RAPD fingerprint; nucleopolyhedrovirus; virus susceptibility

自 Grace (1962) 首次成功建立传代的桉蚕 *Antheraea eucalypti* 细胞系以来，昆虫细胞培养技术得到了极大的发展，目前已建立了源自 100 多种昆虫的 500 多株昆虫细胞系（Lynn, 2001, 2007）。昆虫细胞系已广泛应用于生物学、农业和医学等领域，特别是在昆虫病理学、生理学研究等方面发挥着重要的作用（Granados *et al*., 2007）。

家蚕 *Bombyx mori* 是我国的重要经济昆虫之

基金项目：国家自然科学基金项目(30971965)；山东省优秀中青年科学家科研奖励基金(BS2010SW010)；“泰山学者”建设工程专项
作者简介：李苗苗，女，1988 年生，山东青州人，硕士研究生，从事昆虫细胞培养和害虫生物防治的研究，E-mail: limiaomiao1025@sohu.com
* 通讯作者 Corresponding author, E-mail: cyli@qau.edu.cn
收稿日期 Received: 2011-08-18；接受日期 Accepted: 2011-10-18

一，家蚕核型多角体病毒（*B. mori* nucleopolyhedrovirus，BmNPV）是引起家蚕严重感染的主要致病因子，在生产上常造成巨大经济损失。研究BmNPV和寄主之间的相互关系，阐明其抗性机理一直是人们关注的焦点（刘晓勇等，2008）。BmNPV作为杆状病毒表达载体系统（baculovirus expression vector system，BEVS）的主要载体之一，在生产外源重组蛋白方面有着广阔的应用前景（吴小锋等，2004）。同时，家蚕也是研究动物生长和发育的重要模式昆虫，特别是随着家蚕基因组测序的完成和生物信息学的发展，基因功能的研究迫在眉睫（Xia *et al*.，2004）。为满足以上研究和应用的需要，建立具有特殊性能的家蚕细胞系将具有重要的理论意义和应用价值。家蚕细胞培养和细胞系的建立始于20世纪50年代，目前国内外已报道的家蚕细胞系有十余株（彭建新等，1989；Pandharipande，1994；Sudeep *et al*.，2002；Khurad *et al*.，2006；潘敏慧等2006a），但对病毒敏感、能够广泛应用的家蚕细胞系则较少，而目前应用最多的BmN家蚕细胞系却存在着代龄高和老化等现象（普孝英等，2003），远不能满足科研和生产的需要。因此，本研究以家蚕品种"大造"为材料，建立了一株对BmNPV高度敏感的新细胞系，将为家蚕的生理学、病理学和基因功能组学的研究提供理想的离体材料。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 供试昆虫：家蚕品种"大造"由山东省蚕业研究所提供。

1.1.2 昆虫细胞系：家蚕胚胎细胞系Bm-Em-1由本研究建立，取第28代的细胞用于试验；粉纹夜蛾 *Trichoplusia ni* 胚胎细胞系BTI-Tn5B1-4（High Five）和草地贪夜蛾 *Spodoptera frugiperda* 卵巢细胞系Sf-9由美国康奈尔大学BTI研究所Granados博士惠赠，分别取第88代和第30代的细胞用于试验。

1.1.3 供试病毒：家蚕核型多角体病毒（BmNPV）由浙江大学昆虫科学研究所张传溪教授提供；苜蓿银纹夜蛾 *Autographa californica* 核型多角体病毒（AcMNPV）由美国康奈尔大学BTI研究所Granados博士惠赠。

1.1.4 培养基和血清：TNM-FH昆虫细胞培养基（Thermo Scientific HyClone公司）并辅以15%或10%的胎牛血清（Thermo Scientific HyClone公司）。

1.1.5 试剂：基因组DNA纯化试剂盒Mag-Extractor®-Genome为TOYOBO公司产品；引物OPU-09（5′-CCACATCGGT-3′）、OPU-10（5′-ACCTCGGCAC-3′）、No. 2引物（5′-CCGCATCTAC-3′）（Kawai and Mitsuhashi，1997）和 *T. ni* 特异引物（5′-TTGCTGTCCA-3′）（Li *et al*.，2003）由上海生工生物工程技术服务有限公司合成；*Taq* DNA聚合酶、dNTPs和DNA分子量标准Trans 2K Plus Ⅱ等购自北京全式金生物技术有限公司。

1.2 细胞原代培养

参照Meng等（2008）方法，取催青的"大造"蚕卵（胚胎发育至反转期）约50粒，在超净工作台内经10%次氯酸钠和75%酒精分别消毒5 min，无菌水洗3次，再用TNM-FH培养基洗1次；将卵粒转移至孔径100 μm的细筛（BD Falcon公司）中，浸于装有10 mL含15%胎牛血清TNM-FH培养基的培养皿中，用灭菌的橡胶头研磨卵粒。取1.5 mL细胞滤液移入装有3.5 mL培养基的25 cm^2 培养瓶（Corning公司）中，置于28℃培养箱中静置培养，在倒置相差显微镜IX71（Olympus公司）下观察，根据细胞的生长状态，每隔10～15 d更换不同比例的新鲜培养基。

1.3 细胞传代培养

待原代培养的细胞生长并铺满培养瓶瓶底，在超净工作台中用吸管轻轻吹打贴壁细胞，制成细胞悬液。以2∶3（v/v）的比例（取2 mL细胞悬液加入3 mL新鲜培养基）传代，待细胞稳定传代10代后，将培养基中的血清浓度降至10%，以1∶4（v/v）的比例进行传代，20代后细胞在含10%胎牛血清的TNM-FH培养基中生长稳定，在28℃条件下每隔6～7 d传代1次，建立家蚕胚胎细胞系并进行命名。在倒置相差显微镜下观察细胞的形态并拍照，随机选取100个细胞，通过显微标尺测量细胞的大小。

1.4 细胞核型分析

对数生长期的细胞加秋水仙素至终浓度0.1 μg/mL，继续培养15 h后1 000 r/min离心10 min收集细胞，悬浮细胞于4 mL 0.5%的KCl溶液中，于27℃低渗处理10 min；加4 mL固定液（甲醇∶冰醋酸=3∶1，v/v）处理5 min后离心收集细胞，加入4 mL固定液重新悬浮细胞，将细胞悬液滴于预冷的载玻片上，晾干，Gemisa染色后，于CX31生物显微镜（Olympus公司）下观察和拍照。

1.5　细胞系的 RAPD 指纹图谱分析

参照 Meng 等(2008)的方法，使用 TOYOBO 公司的基因组 DNA 纯化试剂盒，分别提取家蚕“大造”卵的基因组 DNA 以及家蚕细胞系 Bm-Em-1、粉纹夜蛾细胞系 BTI-Tn5B1-4 和草地夜蛾细胞系 Sf-9 的基因组 DNA。使用随机扩增引物 OPU-09，OPU-10，No.2 引物和 *T. ni* 特异引物，进行 RAPD 分析和细胞系的分子鉴定。

1.6　细胞生长曲线和群体倍增时间的测定

取对数生长期细胞，用血球计数板计数后，用培养基稀释到 2×10^5 细胞/mL 的浓度，加到 25 cm^2 培养瓶中，每瓶 5 mL，28℃条件下培养。每天取 3 瓶细胞，血球计数板计数，计算细胞的浓度，绘制细胞生长曲线，并按 Hayflick(1973)的方法计算细胞群体倍增时间。

1.7　细胞对病毒敏感性的测定

取对数生长期细胞，按 2.0×10^5 细胞/孔的量接入 24 孔细胞培养板(Becton Dickinson 公司)中，每孔 1 mL，28℃培养 2 h 使细胞贴壁，吸去培养基，以感染复数(multiplicity of infection，MOI)为 10 的病毒量分别接种 BmNPV 和 AcMNPV 两种病毒，置于垂直摇床上缓慢摇动，吸附 1 h 后弃去病毒液，每孔加入 1 mL 新鲜培养基，28℃培养箱中培养；每个处理 3 次重复。在倒置显微镜下检查病毒侵染结果并拍照，以细胞内形成病毒多角体作为感染的指标，计算病毒的感染率。

1.8　数据统计与分析

统计的细胞大小(平均值 ± 标准差)、细胞群体倍增时间测定等数据的处理、分析以及细胞生长曲线的绘制均采用 Microsoft Excel 软件。

2　结果与分析

2.1　家蚕胚胎细胞的原代培养和细胞系的建立

从 2008 年 6 月开始对家蚕“大造”品种的反转期胚胎细胞进行原代培养，所用培养基是含 15% 胎牛血清的 TNM-FH 培养基，在原代培养过程中细胞生长状态较好，但长势缓慢，培养 3 d 细胞开始贴壁，逐渐伸长拉网形成网状组织(培养 2 个月的细胞)(图 1：A)，之后从网状基质中开始分裂出新生细胞(培养 4 个月的细胞)(图 1：B)，随着细胞逐渐分裂，形成的细胞量增加，细胞逐渐铺满瓶底(培养 8 个月的细胞)(图 1：C)，整个原代培养历时近 1 年，开始第 1 次传代，10 d 后进行了第 2 次传代，以后根据细胞的生长状态适当调整传代时间和更换培养基的比例。随着细胞增殖能力的不断增强，传代时间不断缩短，10 代后一般 6 ~ 7 d 可传代 1 次，细胞生长逐渐稳定，将培养基中胎牛血清的含量降至 10%，细胞适应很快，生长状态良好，能稳定传代，目前已传至 40 余代，细胞系建立成功，命名为 QB-Bm-Em-1(简称为 Bm-Em-1)。

该细胞系呈贴壁生长，细胞形态以短梭形细胞和圆形细胞为主，其中圆形细胞的比例占 47.4%，直径为 12.58 ± 1.98 μm，短梭形细胞比例为 52.6%，大小为(24.95 ± 4.34) μm ×(9.74 ± 1.60) μm(图 1：D)。

2.2　细胞的核型分析

在 Olympus CX31 生物显微镜下观察细胞系 Bm-Em-1 的染色体玻片，染色体呈短棒状和颗粒状，最短的约 1 μm，最长的达 7 μm，数量多且不等，少的有 28 条，最多的有近 300 条，多数在 150 ~ 180 条之间(图 2)，符合典型的鳞翅目昆虫细胞染色体特征，细胞染色体呈异倍化。

2.3　细胞系的 RAPD 指纹图谱分析

以家蚕“大造”卵以及家蚕细胞系 Bm-Em-1、粉纹夜蛾细胞系 BTI-Tn5B1-4 和草地夜蛾细胞系 Sf-9 的基因组 DNA 为模板，采用 4 条引物分别进行 RAPD 指纹图谱分析，结果见图 3。4 条引物扩增的 DNA 多态性片段长度在 200 ~ 3 000 bp 之间，家蚕细胞系 Bm-Em-1 和“大造”卵在引物 OPU-09 扩增图谱中具有 4 条特异谱带(2 210，1 880，670 和 500 bp)，在引物 OPU-10 扩增图谱中有 3 条特异谱带(1 240，920 和 510 bp)，在 *T. ni* 特异引物扩增图谱中有 2 条特异谱带(1 690 和 760 bp)，在 No.2 引物扩增图谱中有 3 条特异谱带(2 460，1 240 和 650 bp)，与 BTI-Tn5B1-4 和 Sf-9 细胞的扩增谱带不同。细胞系 Bm-Em-1 与“大造”卵只有个别谱带有所不同，表明细胞系 Bm-Em-1 与家蚕品种“大造”有相同的遗传背景，为家蚕细胞系。

2.4　细胞生长曲线和群体倍增时间

测定了第 28 代细胞的生长情况，以培养时间为横坐标，以细胞密度为纵坐标，绘制细胞生长曲线(图 4)。培养 24 h 细胞密度变化不大，48 ~ 96 h 细胞生长速度增加，但增长缓慢，120 h 生长速度明显加快，呈对数期生长，到 168 h 细胞密度达到最高，达到 6.0×10^5 cells/mL。之后由于营养缺乏和生长空间受限，细胞聚堆、生长缓慢，细胞密度逐渐下降。按 Hayflick(1973)的公式计算，Bm-Em-1 细胞系的群体倍增时间为 82.2 h。

图 1　家蚕胚胎细胞原代培养和细胞系 Bm-Em-1 形态显微观察(相差观察法)

Fig. 1　Phase contrast micrographs of *Bombyx mori* cell line Bm-Em-1 and its primary culture

A：原代培养 2 个月的细胞 Cells after two months of culture；B：原代培养 4 个月的细胞 Cells after four months of culture；C：原代培养 8 个月的细胞 Cells after eight months of culture；D：细胞系 Bm-Em-1 第 28 代的细胞 The 28th generation cells.

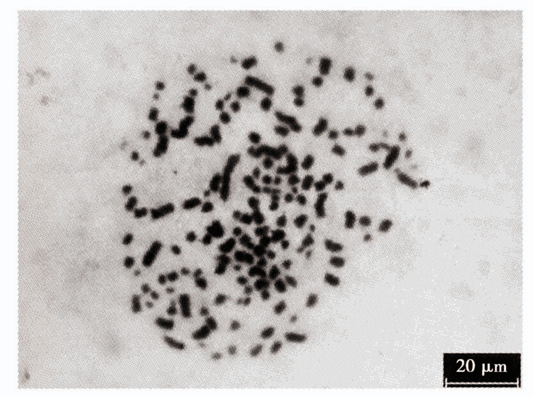


图 2　家蚕细胞系 Bm-Em-1 的染色体

Fig. 2　Chromosomes of *Bombyx mori* cell line Bm-Em-1

2.5　细胞对 AcMNPV 和 BmNPV 的敏感性

细胞系 Bm-Em-1 接种 AcMNPV 96 h 后，圆形细胞数量增加，梭形细胞数量减少，且细胞表面出现一些明亮的小颗粒，但是细胞核内并未发现有多角体产生，该细胞系不能被 AcMNPV 所侵染(图 5：B)。该细胞系接种 BmNPV 48 h，可以观察到比较明显的细胞病理变化，细胞核膨大，接种 96 h 后，细胞核中有许多折光性较强的多角体，平均细胞的感染率为 91.3%，且细胞的形态也发生了变化，绝大多数细胞为圆形(图 5：A)；接种 BmNPV 120 h 以后，细胞开始破裂，多角体从细胞中释放出来。

3　讨论

昆虫细胞系的建立一般比较困难且需要较长的时间，本研究从家蚕胚胎组织成功建立了 Bm-Em-1 细胞系，经历了细胞贴壁、网状组织形成、细胞不断增殖和传代等过程，耗时近 1 年。我们在建系过程中发现，影响细胞系建立的关键步骤是组织和细胞的贴壁问题。贴壁组织比不贴壁的组织更容易形

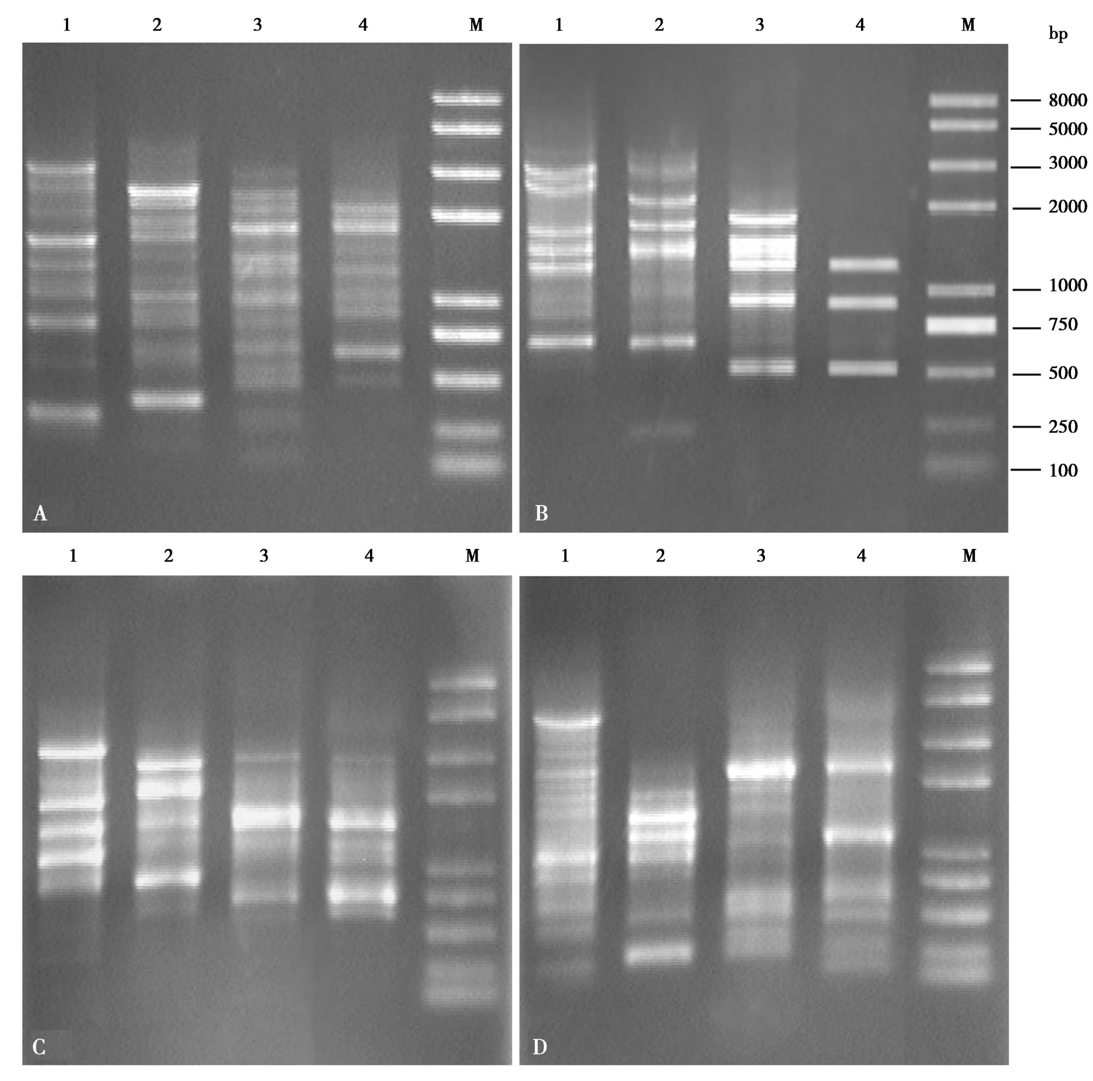


图 3　家蚕卵和几种细胞系基因组 DNA 的 RAPD 图谱

Fig. 3　RAPD profile of *Bombyx mori* eggs and several insect cell lines

A：引物 OPU-09 Primer OPU-09；B：引物 OPU-10 Primer OPU-10；C：*T. ni* 特异引物 *T. ni* specific primer；D：No. 2 引物 Primer No. 2. M：DNA 分子量标准 Trans 2K Plus Ⅱ DNA Marker；1：BTI-Tn5B1-4 细胞 BTI-Tn5B1-4 cells；2：Sf-9 细胞 Sf-9 cells；3：Bm-Em-1 细胞 Bm-Em-1 cells；4：家蚕卵 *B. mori* eggs.

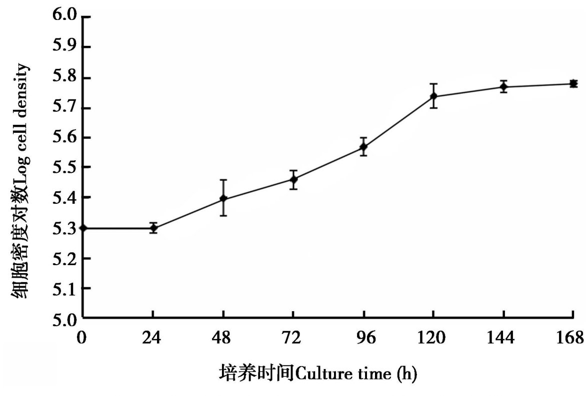


图 4　家蚕细胞系 Bm-Em-1 的生长曲线

Fig. 4　Growth curve of *Bombyx mori* cell line Bm-Em-1

图中数据为平均值 ± 标准差。Values in the figure are mean ± *SD*.

成网状基质和新生细胞，不贴壁的组织中细胞的增殖能力较差且容易死亡，随着培养液的更换，悬浮在培养基中的衰老组织和细胞被逐渐淘汰。

昆虫细胞作为新型生物反应器用于病毒杀虫剂和重组蛋白的生产，特别是应用昆虫杆状病毒表达系统生产有重要价值的基因工程药物受到人们越来越多的关注。目前最主要的两类昆虫杆状病毒表达系统是 AcMNPV 和 BmNPV 表达系统，BmNPV/家蚕表达系统由于其寄主个体较大、易饲养、表达量高，特别适合产业化水平开发的要求（吴小锋等，2004）。但 BmNPV 寄主专一，重组病毒的构建只能使用家蚕细胞，因此，急需建立和筛选对 BmNPV 敏感性更高的细胞系。有关家蚕细胞系的建立已有

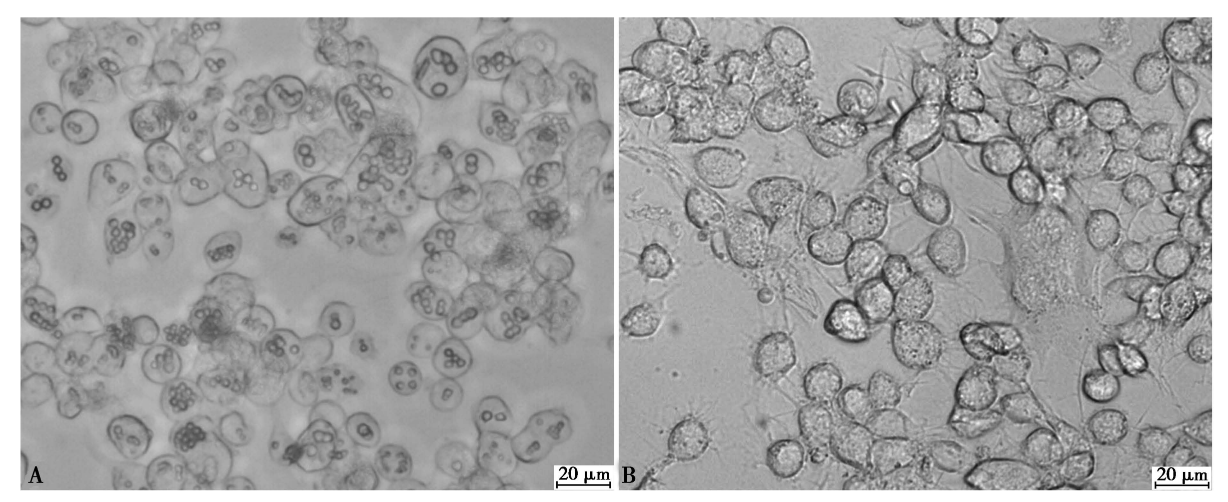


图 5 家蚕细胞系 Bm-Em-1 感染 BmNPV 和 AcMNPV 96 h 的形态(明场观察法)

Fig. 5 Bright field micrographs of cell line Bm-Em-1 infected with BmNPV and AcMNPV at 96 h post infection

A: 感染 BmNPV 的细胞 Cells infected with BmNPV; B: 感染 AcMNPV 的细胞 Cells infected with AcMNPV.

许多报道，但只有少数几株细胞系能够支持 BmNPV 的复制，如国际上最常用的家蚕细胞系 BmN 对 BmNPV 10 d 的感染率仅为 72.2%（张欣等，2011），且目前存在着细胞代龄高和老化现象（普孝英等，2003）；Sudeep 等（2002）建立的 BM-1296 细胞系和 BM-197 细胞系对 BmNPV 10 d 的感染率最高可分别达到 90% 和 70%；潘敏慧等（2006a）建立的 BmE-SWU1 和 BmE-SWU2 对 BmNPV 96 h 的感染率分别为 84% 和 56.17%。本研究建立的 Bm-Em-1 细胞系对 BmNPV 高度敏感，4 d 的感染率超过 90%，该细胞系来源于胚胎组织，由各种类型的细胞混合组成，可继续进行细胞克隆，筛选更敏感的细胞株，以用于 BmNPV 的离体复制研究和重组病毒的构建。利用 BmNPV 表达系统在 Bm-Em-1 中表达重组蛋白的水平，还需与 AcMNPV 表达系统在 BTI-Tn5B1-4 和 Sf-9 细胞中的表达进行比较，进一步对这一表达系统进行评价。

本研究的 RAPD 指纹图谱表明，Bm-Em-1 细胞系与原蚕种“大造”扩增产物除主要谱带相同外，还有各自特异的扩增谱带，可能与细胞在体外培养过程中不断地选择和淘汰使其基因组发生了某些变化以及染色体异倍化等原因有关(潘敏慧等，2006b)。Bm-Em-1 细胞系染色体数量多、异倍化现象明显，符合鳞翅目昆虫细胞系染色体的特征。目前导致昆虫细胞系染色体异倍化的原因还没有统一的认识，可能与许多因素有关，如在长期离体培养条件下，可见光、温度、pH 值和培养基的变化可能引细胞的变异和提高细胞的突变率，或者细胞发生有丝分裂异常或核内的无丝分裂等(普孝英等，2003)。染色体核型是昆虫细胞系生物学特征之一，细胞异倍化可能影响细胞的生物学特性，对细胞系的应用会产生一定的影响。因此，了解染色体异倍化的成因以及如何保持细胞遗传学性状的稳定，具有重要的理论价值。

近年，昆虫细胞系在基因表达和功能研究等领域的应用日益受到人们的关注（Smagghe *et al.*，2009），家蚕是鳞翅目昆虫的模式生物，家蚕全基因组测序已经完成（Xia *et al.*，2004），接下来的工作更重要是基因功能的研究，基因功能的阐明对于家蚕的深入开发利用和农林害虫的防治具有重要的理论意义和实践价值。由于在活体寄主内各个器官和组织间的相互作用而使研究复杂化，而细胞的离体培养为研究基因功能提供了简单、快速和准确的手段，细胞系 Bm-Em-1 来自于家蚕品种“大造”的胚胎细胞，与家蚕基因组测序的材料相同，可为家蚕基因功能的解析提供一个细胞水平上的研究平台。

参 考 文 献 (References)

Grace TDC, 1962. Establishment of four strains of cells from insect tissues grown *in vitro*. *Nature*, 195: 788 – 789.

Granados RR, Li G, Blissard GW, 2007. Insect cell culture and biotechnology. *Virologica Sinica*, 22(2): 83 – 93.

Hayflick L, 1973. Subculturing human diploid fibroblast cultures. In: Kruse PF, Patterson MK eds. Tissue Culture Methods and Application. Academic Press, New York. 220 – 223.

Kawai Y, Mitsuhashi J, 1997. An insect cell line discrimination method by RAPD-PCR. *In Vitro Cell Dev. Biol. Anim.*, 33: 512 – 515.

Khurad AM, Kanginakudru S, Qureshi SO, Rathod MK, Rai MM,

Nagaraju J, 2006. A new *Bombyx mori* larval ovarian cell line highly susceptible to nucleopolyhedrovirus. *Journal of Invertebrate Pathology*, 92: 59 – 65.

Li G, Hashimoto Y, Granados RR, 2003. Growth characteristics and expression of recombinant protein by new cell clones derived from *Trichoplusia ni* (BTI Tn5B1-4) High Five cells. *Bioprocessing*, 2: 35 – 38.

Liu XY, Chen KP, Yao Q, Li J, Cai KY, 2008. Proteome analysis of silkworm (*Bombyx mori*) midgut proteins related to BmNPV infection resistance or susceptibility. *Acta Entomologica Sinica*, 51(4): 443 – 448. [刘晓勇，陈克平，姚勤，李军，蔡克亚，2008. 家蚕中肠组织抗核型多角体病毒病的相关蛋白分析. 昆虫学报，51(4): 443 – 448]

Lynn DE, 2001. Novel techniques to establish new insect cell lines. *In Vitro Cell Dev. Biol. Anim.*, 37(6): 319 – 321.

Lynn DE, 2007. Lepidopteran insect cell line isolation from insect tissue. In: Murhammer DW ed. Methods in Molecular Biology, vol. 338: Baculovirus and Insect Cell Expression Protocols, 2/e. Humana Press Inc., Totowa, New Jersey. 139 – 154.

Meng MJ, Li TL, Li CY, Li GX, 2008. A suspended cell line from *Trichoplusia ni* (Lepidoptera): characterization and expression of recombinant proteins. *Insect Science*, 15: 423 – 428.

Pan MH, Chen M, Ding YB, Hong XJ, Lu C, 2006a. Establishment and characterization of an embryo cell line of *Bombyx mori*, BmE-SWU2. *Acta Entomologica Sinica*, 49(5): 719 – 725. [潘敏慧，陈敏，丁裕斌，洪锡钧，鲁成，2006a. 家蚕胚胎细胞系 BmE-SWU2 的建立及其生物学特性研究. 昆虫学报，49(5): 719 – 725]

Pan MH, Feng ZY, Tian ZQ, Liu M, Lu C, 2006b. DNA fingerprinting analysis of silkworm embryo cell lines. *Journal of Molecular Cell Biology*, 39(6): 537 – 543. [潘敏慧，冯振月，田志强，刘敏，鲁成，2006b. 家蚕胚胎细胞系的 DNA 指纹图谱分析. 分子细胞生物学报，39(6): 537 – 543]

Pandharipande TN, 1994. Two new continuously growing cell lines from *Bombyx mori* (Lepidoptera: Bombycidae). *Appl. Entomol. Zool.*, 29: 604 – 607.

Peng JX, Yu ZH, Li LL, 1989. Replication of *Bombyx mori* nuclear polyhedrosis virus in a continuous cell line. *Journal of Central China Normal University*, 23(4): 541 – 545. [彭建新，余泽华，黎路林，1989. 家蚕 NPV 在传代细胞中的复制. 华中师范大学学报(自然科学版)，23(4): 541 – 545]

Pu XY, Hong XJ, Chen M, Lu C, 2003. Studies on mitosis and chromosomes of BmN cells. *Acta Sericologica Sinica*, 29(2): 136 – 141. [普孝英，洪锡钧，陈敏，鲁成，2003. BmN 细胞有丝分裂及其染色体的研究. 蚕业科学，29(2): 136 – 141]

Smagghe G, Goodman CL, Stanley D, 2009. Insect cell culture and applications to research and pest management. *In Vitro Cell Dev. Biol. Anim.*, 45(3 – 4): 93 – 105.

Sudeep AB, Mishra AC, Shouche YS, Pant U, Mourya DT, 2002. Establishment of two new cell lines from *Bombyx mori* (L.) (Lepidoptera: Bombycidae) and their susceptibility to baculoviruses. *Indian J. Med. Res.*, 115: 189 – 193.

Wu XF, Cao CP, Xu YX, Lu XM, 2004. Construction of a host range expanded hybrid recombinant baculovirus of BmNPV and AcNPV. *Science in China Series C Life Sciences*, 34(2): 156 – 164. [吴小锋，曹翠平，许雅香，鲁兴萌，2004. BmNPV 和 AcNPV 扩大寄主域杂交重组病毒表达载体的构建和改进. 中国科学 C 辑: 生命科学，34(2): 156 – 164]

Xia QY, Zhou ZY, Lu C *et al.*, 2004. A draft sequence for the genome of the domesticated silkworm (*Bombyx mori*). *Science*, 306(5703): 1937 – 1940.

Zhang X, Feng Y, Ding WF, Ma T, 2011. Survey and analysis for susceptibility of *in vitro* cultured insect cell lines to AcNPV and BmNPV. *Forest Research*, 24(3): 321 – 326. [张欣，冯颖，丁伟峰，马涛，2011. 离体昆虫细胞对 AcNPV 和 BmNPV 的敏感性测定与分析. 林业科学研究，24(3): 321 – 326]

（责任编辑：赵利辉）